

Burkholderia plantarii と *B. vandii* の分類学的再検討

平川 ゆみ・浦 広幸・古屋 成人・松山 宣明
(九州大学農学部)

Taxonomic reexamination of *Burkholderia plantarii* and *B. vandii*. Yumi HIRAKAWA, Hiroyuki URA, Naruto FURUYA and Nobuaki MATSUYAMA (Laboratory of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kyusyu University, Fukuoka 812-8581)

A comparison of the biochemical, physiological and pathological characteristics of *Burkholderia plantarii* and *B. vandii* was conducted. These two species had similar bacteriological characteristics and were different from *B. gladioli* pv. *gladioli*, *B. gladioli* pv. *alliicola* and *B. glumae*. *B. plantarii* and *B. vandii* differed only in their utilization of L-rhamnose. *B. vandii* will be a consistent species with *B. plantarii*.

Key words: *Burkholderia plantarii*, *B. vandii*, taxonomy

緒 言

イネ苗立枯細菌病菌 (*Burkholderia plantarii*, 旧名 *Pseudomonas plantarii*) は、1982年に千葉県各地で立枯症状を呈した育苗箱中のイネ苗およびその育苗土から初めて分離された細菌であり、1987年に畔上らにより新種の植物病原細菌として命名、報告された¹⁾。一方、*Burkholderia vandii* はラン科植物パンダの根から分離された細菌で、1994年に浦上らにより新種として記載された¹⁰⁾。しかし、本菌はトロポロンを産生し、イネ苗、グラジオラス葉片およびタマネギ鱗片に病原性を示すなど *B. plantarii* と類似した性質を持つ¹⁰⁾ため、両種細菌が種レベルで独立した存在であるのかどうか疑問視されている。

そこで、本研究では両種細菌の細菌学的・病理学的諸性質を比較し、両種細菌の分類学的位置づけを再検討した。

材料および方法

1. 供試菌株

Burkholderia plantarii, *B. vandii*, *B. gladioli* pv. *gladioli*, *B. gladioli* pv. *alliicola* および *B. glumae* の4種計18菌株を供試した (Table 1)。このうち、MAFF301728, MAFF301729, MAFF301730は、*B. plantarii* および *B. vandii* が新種として記載される以前の1986年に、褐色に腐敗したラン科植物パンダの葉から分離され、木嶋らにより *B. gladioli* pv. *gladioli* と同定され⁷⁾、その後トロポロンを産生することが報告されている菌株である¹⁾。

2. 生理・生化学的試験

各種細菌の生理・生化学的試験は、既報^{2-5, 10)}の方法に準拠し、グラム反応、フルオレシンの生成、ブドウ糖の酸化・発酵試験、40℃の生育性、生長素要求性、オキシダーゼ活性、カタラーゼの検出、Tween 80の加水分解、グルコン酸の酸化、アルギニン加水分解、チロシナーゼの検出、レバン産生、硝酸塩の還元性、脱窒反応、コーン氏液での生育、ゼラチン液化試験および糖・有機酸の利用性試験を行った。糖の利用性試験の基質として、D-トレハロース、シュクロース、ラクトース、L-ラムノース、D-アラビノース、D-グルコース、D-マンノース、ガラクトース、イノシトール、D-リボース、ダルシトール、マルトース、レプロース、*myo*-イノシトール、 α -メチル-D-グルコシド、 β -メチル-D-グルコシド、ラフィノース、およびアドニトールを用い、有機酸の利用性試験の基質として、レブリン酸、ニコチン酸、安息香酸、*m*-ヒドロキシ安息香酸、L-スレオニン、L-酒石酸、D-酒石酸、シトラコン酸、メサコン酸、DL-スレオニン、アセトアミド、L-バリン、 β -アラニン、L-アルギニン、DL-イソロイシンを用いた。また、鉄加用 Ayers 培地 (AFG 培地) における結晶析出 (トロポロン産生性の検定)¹⁾、松田培地におけるシュウ酸カルシウムの析出⁹⁾および抗トマトかいよう病菌物質産生性^{8, 11)}についても調べた。全ての試験には、YPDA 斜面培地 (ペプトン 0.6g, デキストロース 3g, 酵母エキス 3g, 寒天 15g, 蒸留水 1,000ml, pH 7.2) で30℃, 48時間培養した菌体を用いた。

3. 接種試験

a. イネに対する病原性試験

幼苗, 初および葉鞘に対する病原性試験を以下の方法

Table 1. Bacterial strains used in this experiment

Strain	Origin	Source
<i>Burkholderia plantarii</i>		
JCM5492 ^T	Rice seedling	JCM ^{a)}
MAFF302387	Rice seedling	MAFF ^{b)}
MAFF302484	Rice seedling	MAFF
MAFF302392	Rice seedling	MAFF
MAFF302412	Rice seedling	MAFF
MAFF302467	Rice seedling	MAFF
MAFF302470	Rice seedling	MAFF
MAFF302475	Rice seedling	MAFF
MAFF302481	Nursery soil	MAFF
MAFF302485	Rice seedling	MAFF
<i>B. vandii</i>		
JCM7957 ^T	Vanda root	JCM
<i>(B. gladioli pv. gladioli)</i>		
MAFF301728	Vanda leaf	MAFF
MAFF301729	Vanda leaf	MAFF
MAFF301730	Vanda leaf	MAFF
<i>B. gladioli pv. gladioli</i>		
ATCC10248 ^T	Gladiolus	ATCC ^{c)}
MAFF302515	Tulip	MAFF
<i>B. gladioli pv. alliicola</i>		
ATCC19302	Onion	ATCC
<i>B. glumae</i>		
MAFF301169 ^T	Rice grain	MAFF

a) Japan Collection of Microorganisms.

b) Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries.

c) American Type Culture Collection.

により行った。

幼苗に対する病原性は, 表面殺菌した「あそみのり」種子を0.5%素寒天20mlを分注した100ml三角フラスコ中に20粒ずつ播種し, これに0.4mlの細菌懸濁液(約10⁸cfu/ml)を接種し, 30°Cで24時間白色蛍光灯下で10日間育苗し, 発病の有無を調べた。

初に対する病原性は, ワグネルポット(1/5000a)で栽培した開花期の穂を細菌懸濁液(約10⁸cfu/ml)に3分間浸漬接種することにより調べた。

葉鞘に対する病原性は, 約10⁸cfu/mlの細菌懸濁液0.7mlを穂ばらみ期の止葉葉鞘に注入することにより調べた。

b. グラジオラスおよび各種ラン科植物に対する病原性試験

YPDA培地で2日間30°Cで培養した供試細菌を, 昆虫針を用いてグラジオラスおよび各種ラン科植物の葉片に穿刺接種した。接種後, 30°Cで24時間白色蛍光灯下に3~4日間おいて発病の有無を調査した。

c. タマネギ鱗片腐敗能試験

新鮮なタマネギの皮を除去した後, 滅菌ナイフで切断し, 底部に滅菌水で湿らせたろ紙を敷いた滅菌ペトリ皿中に鱗片を静置した。YPDA培地で2日間30°Cで培養した供試菌株を昆虫針を用いて穿刺接種し, 30°Cで3日間培養し, 腐敗の有無を調べた。

結果および考察

B. plantarii と *B. vandii* の分類学的再検討を行うこと

Table 2. Differential characteristics of *Burkholderia* spp.

Characteristic	<i>B. pla</i> (n=10) ^{a)}	<i>B. van</i> (n=1)	<i>(B. gla. pv. gladioli)</i> ^{b)} (n=3)	<i>B. gla. pv. gladioli</i> (n=2)	<i>B. gla. pv. alliicola</i> (n=1)	<i>B. glu</i> (n=1)
Denitrification	+	+	d	-	±	(+)
Growth at 40°C	d	-	-	+	+	+
Growth in Cohn's broth	+	+	+	+	+	-
Production of tropolone	+	+	+	-	-	-
CaC ₂ O ₄ · H ₂ O accumulation	-	-	-	+	-	+
Utilization of						
L-Rhamnose	+	-	-	-	-	-
Raffinose	-	-	-	-	-	+
L-Tartrate	+	+	+	+	+	-
D-Tartrate	+	+	+	+	+	-
Citraconate	+	+	+	+	+	-
Mesaconate	+	+	+	+	+	-
Adonitol	-	-	-	+	-	+
DL-Threonine	-	-	-	+	-	-
Acetamide	d	-	-	+	-	-
Anti-C. m ^{c)} substance production	d	+	+	d	-	+

Symbols: +, positive; (+), weakly positive; -, negative; ±, not determined; d, 11-89% of strains are positive.

a) No. of strains. b) MAFF301728, MAFF301729, MAFF301730. c) *Clabibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* N6601 and *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* ATCC27794^T.

Table 3. Pathogenicity of *Burkholderia* spp. to various plants

Strain	Pathogenicity									
	Rice leaf-sheath	Rice seedling	Rice grain	Gladiolus	Dendrobium	Cymbidium	Oncidium	Phalaenopsis	Vanda	Onion
<i>B. plantarii</i>										
JCM5492 ^T	—	+	—	+	—	±	±	—	±	(+)
MAFF302387	—	+	—	+	—	—	—	—	—	+
MAFF302484	—	+	—	+	—	—	—	—	—	+
MAFF302392	—	+	±	(+)	—	—	—	—	—	—
MAFF302412	NT	+	NT	(+)	—	—	—	—	—	+
MAFF302467	NT	+	NT	+	—	—	—	—	—	+
MAFF302470	NT	+	NT	(+)	—	—	—	—	—	+
MAFF302475	NT	+	NT	(+)	—	—	—	—	—	+
MAFF302481	NT	+	NT	+	—	—	—	—	—	+
MAFF302485	—	+	+	+	—	—	—	—	—	+
<i>B. vandii</i>										
JCM7957 ^T	—	+	±	+	—	±	—	—	±	+
<i>(B. gladioli</i> pv. <i>gladioli)</i>										
MAFF301728	—	+	±	+	—	—	—	—	—	+
MAFF301729	NT	+	NT	+	—	—	—	—	—	+
MAFF301730	NT	+	NT	+	—	—	—	—	—	+
<i>B. gladioli</i> pv. <i>gladioli</i>										
ATCC10248 ^T	—	+	—	+	+	+	+	+	+	+
MAFF302515	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. gladioli</i> pv. <i>alliicola</i>										
ATCC19302	—	±	—	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. glumae</i>										
MAFF301169 ^T	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Symbols: +, positive; (+), weakly positive; —, negative; ±, not determined; NT, not tested.

を目的とし、生理・生化学的試験および接種試験を行った。

53項目の生理試験の結果、今回供試した *Burkholderia* 属細菌 4 種18菌株間で差異が認められた項目を Table 2 に示した。*B. plantarii* と *B. vandii* は L-ラムノースの利用性において明確な差異が認められた以外はいずれの試験でも同様の結果を示した。

B. plantarii および *B. vandii* は、*B. gladioli* pv. *gladioli* と比較すると、脱窒反応、40℃における生育、トロポロン産生性、およびアドニトール、DL-スレオニン、アセトアミドの利用性試験において、また *B. gladioli* pv. *alliicola* と比較すると、40℃における生育およびトロポロン産生性試験において差異が認められた。さらに *B. glumae* と比較すると、コーン氏液における生育、40℃における生育、トロポロン産生性、シュウ酸カルシウムの析出性およびラフィノース、L-酒石酸、D-酒石酸、シトラコン酸、メサコン酸、アドニトールの利用性試験において差異が認められた。

接種試験の結果を Table 3 に示した。*B. plantarii* の全菌株および *B. vandii* は、イネ幼苗、グラジオラス葉片、

タマネギ鱗片に病原性を示し、イネ葉鞘、苧および各種ラン科植物には明瞭な病原性を示さなかった。これに対し *B. gladioli* および *B. glumae* は供試した各種ラン科植物葉片、グラジオラス葉片およびタマネギ鱗片に対し病原性を示した。

以上のことから、*B. plantarii* および *B. vandii* は細菌学的ならびに病理学的にも非常に類縁性が高く、同種として考えても良いのではないかと推察される。

また、今回供試したバンダから分離され、トロポロン産生性の *B. gladioli* pv. *gladioli* と同定されていた MAFF301728, MAFF301729, MAFF301730 は、いずれの生理・生化学的試験および接種試験においても *B. gladioli* pv. *gladioli* とは異なり、*B. plantarii* あるいは *B. vandii* と同様の性質を示した。以上のことから、これら3菌株を *B. vandii* JCM7957^T とともにバンダから分離された *B. plantarii* として取り扱うことが望まれる。

今後はバンダから細菌の分離を試みるとともに供試菌株を増やし、さらに詳細に細菌学的諸性質を調べる予定である。

摘 要

B. plantarii および *B. vandii* は生理・生化学的試験において、L-ラムノースの利用性で差異が認められた以外は全ての項目で同様の結果を示し、さらに各種植物に対する接種試験においても、差異は認められなかった。したがって、*B. plantarii* および *B. vandii* は細菌学的ならびに病理学的にも同種の菌であると推察された。

引用文献

1) 畔上耕児 (1994) 農技研報 11:1-80. 2) 後藤正夫・瀧川雄一 (1984) 植物防疫 38:339-344. 3) 後藤正夫・瀧川

雄一 (1984) 植物防疫 38:385-389. 4) 後藤正夫・瀧川雄一 (1984) 植物防疫 38:432-437. 5) 後藤正夫・瀧川雄一 (1984) 植物防疫 38:479-484. 6) IYAMA, K., FURUYA, N., TAKANAMI, Y. and MATSUYAMA, N. (1995) Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 61:470-476. 7) 木嶋利男・手塚徳弥・山下修一・土居養二 (1986) 日植病報 52:151 (講要). 8) 松尾憲総 (1993) 植物病原性微生物研究法 (脇本 哲監修) ソフトサイエンス社: pp. 459-465. 9) 松田 泉・小磯邦子・岩崎成夫・佐藤善司 (1988) 日植病報 54:120 (講要). 10) 坂崎利一・島崎悦郎 (1986) 新細菌培地学講座—下— 近代出版 : pp.4-176. 11) URAKAMI, T., ITO-YOSHIDA, C., ARAKI, H., KIJIMA, T., SUSUKI, K. and KOMAGATA, K. (1994) Int. J. Syst. Bacteriol. 44:235-245.

(1999年4月28日 受領)